

Study on the active conformation of the bioregulatory peptides

著者	Kobayashi Naohiro
内容記述	Thesis (Ph.D. in Agriculture)--University of Tsukuba, (A), no. 1199, 1994.3.25
発行年	1994
URL	http://hdl.handle.net/2241/4192

氏 名(本 籍)	こ ばやし なお ひろ 小 林 直 宏 (埼 玉 県)
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1,199 号
学位授与年月日	平 成 6 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	農 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	Study on the active conformation of the bioregulatory peptides (生体機能調節ペプチドの活性型コンホメーションに関する研究)
主 査	筑波大学教授 理学博士 宗 像 英 輔
副 査	筑波大学教授 農学博士 村 上 和 雄
副 査	筑波大学教授 農学博士 日下部 功
副 査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌

論 文 の 要 旨

今日までに、多くの生体機能調節ペプチドが広範な生物種より単離精製され、その化学構造や特異的レセプターが同定されてきている。しかるに、分子量1000前後の生体機能調節ペプチドは溶液中において特定のコンホメーションをとりにくい直鎖型の化学構造を有するものが多く、リガンドーレセプター間の相互作用の解析を困難にしている。この問題に対する解決策として、主鎖ないし側鎖間に環状部位を導入することで安定化させ、溶液中におけるコンホメーションを解析する方法が近年よく用いられる。本研究では、従来法を改良した立体構造解析法を用い、F-アクトンと強く結合することで肝細胞に対する毒性を発現する二環性構造のファロイジン、単環性構造のヴィロシニン、そして毒性を失った単環性構造のファロイジン誘導体であるセコファロイジンおよびデチオファロイジンについて、また、直鎖部分と環状部分とを持つ、抗菌性ペプチド、バシトラシン A について 2 次元 NMR 法および分子モデリング法による解析を行い、活性と立体構造の相関について調べた。

ペプチドは90%軽水/10%重水または100%重水に溶解し、500MHzのプロトン NMR を超伝導核磁気共鳴装置にて測定した。プロトシグナルの帰属には 2 次元スペクトルである HOHAHA スペクトル、DQFCOSY スペクトル、NOESY スペクトルおよび ROESY スペクトルを用いた。NOESY スペクトルにおけるプロトンシグナル間に生じるクロスピークの強度はそのプロトン間の距離の 6 乗に反比例する。それらクロスピークより見積もられたプロトン間の距離関係を束縛条件とした、束縛エネルギー極小化計算および束縛分子動力学計算をファロイジンとヴィロシニンに関しては QUANTA-CHARMM プログラムを、また、バシトラシン A に関しては NMRGRAF プログラムを用い、計算およびグラフィック表示はそれぞれ、TAITAN750および Iris-INDIGO ワークステーションで行った。

毒性のあるペプチドにおいて、6位 Trp のインドール環による環電流効果は5位 Ala メチルプロトンのシグナルを高磁場側へシフトさせたが、毒性のないペプチドではいずれも高磁場側へのシフトは観測されなかった。このことから、毒性のあるペプチドは6位 Trp のインドール環が共通の配向をとっているものと考えられる。NOESY スペクトルおよび ROESY スペクトルによって得られたプロトン間の距離情報では、毒性のあるファロイジン、ヴィロイシンの3位から6位の部位でプロトン間の距離関係がよく似ていた。これまでに報告されているファロイジンの構造活性相関の研究では、4位から6位におけるアミノ酸残基はF-アクチンとの相互作用に必須であることがわっているが、本研究における立体構造解析により、ファロイジンおよびヴィロイシンの毒性発現には3位から6位にかけてタイプII β ターンが存在すること、6位 Trp のインドール環の正しい配向が必要であることが示され、毒性の消失はタイプII β ターンや6位 trp のインドール環の配向や3位から6位にかけてのコンホメーションが二重環構造の一部開裂により大きく歪曲されたためであることが明らかにされた。バシトラシンAにおいて得られたNMRデータをよく満たす立体構造には3位から5位および7位から9位にかけて逆並行 β シート様の構造が認められた。この構造では疎水的アミノ酸残基である3位 Leu, 8位 Ile, 9位の Phe の側鎖間に生じた疎水クラスターにより安定化されており、チアゾリン, 4位 Glu および10位 His の側鎖は空間的に近く、既に報告されている亜鉛イオンとの相互作用部位とよく一致した。

本研究で得られた立体構造はいずれも本質的な活性型コンホメーションに極めて近いものと考えられ、今後この立体構造解析法により、比較的低分子でかつ分子内に部分的あるいは全体的に束縛を受けた生体機能調節やペプチドやその関連化合物に応用できるものと考えられる。

審 査 の 要 旨

近年のペプチド合成技術、NMR や X 線解析技術の発展により、生体機能調整ペプチドの活性と化学構造ないし立体構造との相関は驚くべき精度で求められるようになった。しかるに、現実的には分子量1000前後の分子では安定なコンホメーションをとりにくいため X 線解析または NMR 解析が難しいとされている。申請者の研究では、極めて堅い二重環構造をもち分子量1000以下のペプチド、ファロイジンに関して近年開発された測定法を駆使した NMR 解析を行っている。また本研究では、ファロイジンより柔軟な構造が予想される単環性ペプチドであるヴィロイシン、活性を失っている単環性ペプチドであるセコファロイジンならびにデチオファロイジンに関しても同様の解析を行っている。それにより、現在まで報告されてきた多くのファロイジンの構造活性相関研究で矛盾となった6位 Trp の活性への役割を明らかにしている。さらに本研究では、NMR データを用いて分子モデリング計算をファロイジンおよびヴィロイシンについて行っており、NMR 実験で示唆されていた活性型コンホメーションを明らかにしている。ここで用いられている分子モデリング計算は著者自らが従来若干の改良を加えたプロトコルにより分子量1000前後のペプチドに応用できるよう工夫されている。亜鉛イオンとの結合を介して抗菌性を示すペプチドであるバシトラシンAに関して前述と同様に NMR

解析をおこない分子デモリング計算を行っている。本論文により示された立体構造はこれまでに報告がなく、亜鉛イオンとの結合部位を合理的に説明できている。

また本研究で研究している分子量1000前後のペプチドの厳密な立体構造をもとにした活性相関研究はほとんど例がなく、また立体構造のみならずその動力学的性質まで議論した研究は本論文が始めてといえる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。